

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-027767

(43)Date of publication of application : 31.01.1995

(51)Int.Cl.

G01N 33/547

B05D 1/20

C12Q 1/00

G01N 33/543

(21)Application number : 06-144095

(71)Applicant : BAYER AG

(22)Date of filing : 03.06.1994

(72)Inventor : HEILIGER LUDGER
SIEGMUND HANS-ULRICH

(30)Priority

Priority number : 93 4319037 Priority date : 08.06.1993 Priority country : DE

(54) COVERED CARRIER, MANUFACTURE THEREOF AND USAGE FOR FIXING ORGANIC MOLECULAR ON SURFACE OF SOLID

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide a covered carrier which is suitable for fixing organic molecular such as protein and a method of manufacturing thereof.

CONSTITUTION: An inactive carrier is covered thereover with a monomolecular layer made of a special polymer so as to obtain a covered carrier. This polymer contains 0.8 to 20mol.% of comonomer having at is one end a reactive group which is covalently bonded to protein or another organic molecular to be fixed, through a spacer group, and 0 to 200 of monomolecular layers made of the polymer which does not contain a reactive group for improving the bonding between the carrier and the molecular layer are laid therebetween. Thus manufactured covered carrier can fix protein or another organic molecular with a high degree of efficiency and a high degree of reproducibility.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-27767

(43) 公開日 平成7年(1995)1月31日

| (51) Int.Cl. ⁸ | 識別記号 | 庁内整理番号 | F I | 技術表示箇所 |
|---------------------------|---------|----------|-----|--------|
| G 0 1 N 33/547 | | 9015-2 J | | |
| B 0 5 D 1/20 | | 8720-4 D | | |
| C 1 2 Q 1/00 | C | 6807-4 B | | |
| G 0 1 N 33/543 | 5 2 5 E | 9217-2 J | | |

審査請求 未請求 請求項の数3 F D (全 11 頁)

| | | | |
|--------------|---------------------|----------|---|
| (21) 出願番号 | 特願平6-144095 | (71) 出願人 | 390023607 バイエル・アクチエンゲゼルシャフト BAYER AKTIENGESSELLS CHAFT ドイツ連邦共和国デー51368 レーフエル クーゼン (番地なし) |
| (22) 出願日 | 平成6年(1994)6月3日 | (72) 発明者 | ルトガー・ハイリガー ドイツ51373レーフエルクーゼン・カール ールンブフーシュトラッセ8 |
| (31) 優先権主張番号 | P 4 3 1 9 0 3 7 . 5 | (72) 発明者 | ハンス・ウルリヒ・ジークムント アメリカ合衆国インディアナ州46516エル クハート・レスリー・レイン23119 |
| (32) 優先日 | 1993年6月8日 | (74) 代理人 | 弁理士 小田島 平吉 |
| (33) 優先権主張国 | ドイツ (D E) | | |

(54) 【発明の名称】 被覆担体、その製法、及びその生体分子の固体表面への固定化に対する使用方法

(57) 【要約】

【目的】 蛋白質及び他の生体分子の固定化に適当な被覆された担体とその製造法。

【構成】 不活性な担体を、ラングミュア-ブロッジェット法又は自己集合技術により特別な重合体の単分子層で被覆して被覆担体を作成する。この重合体は、固定化すべき蛋白質又は他の生体分子と共有結合する反応性基を親水性スペーサー基を介して端部に有する共単量体を0.8~20モル%で含有し、そして該担体と該重合体の単分子層の間には両者の接着を改善するために上述した反応性基を含まない重合体の単分子層を0~280層配置させる。

【効果】 このように製造した被覆担体は効率良く且つ再現性良く蛋白質及び他の生体分子を固定化することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 a) 不活性な固体及び

b) ラングミュア-プロジェクト (LB) 法又は自己集合 (SA) 技術に適当な重合体の単分子層、からなり、但し

c) 該重合体が、生物起源の分子を結合するのに適当な活性基を親水性スペーサー基の端に位置して有する共単量体を、すべての共単量体のモル数に対して 0.8~20 モル%、好ましくは 2.5~10 モル%で含有し、そして

d) 不活性な担体 a) 及び単分子層 b) との間に、c) による活性基を含まない、LB 法又は SA 技術に適当な重合体の単分子層を 0~200 配置させる、被覆担体。

【請求項 2】 不活性な担体をラングミュア-プロジェクト (LB) 法に従って又は自己集合 (SA) 技術に従って、これらの技術に適当な重合体の単分子層で被覆する、但し該重合体が、生物起源の分子を結合するのに適当な活性基を親水性スペーサー基の端に位置して有する共単量体を、すべての共単量体のモル数に対して 0.8~20 モル%で含有し、そして該不活性な担体及び該単分子層の間に、該活性基を有する共単量体を含まない、LB 法又は SA 技術に適当な重合体の単分子層を 0~200 配置させる、被覆担体の製造法。

【請求項 3】 請求項 1 の被覆担体の、生物起源の分子を結合させる (固定化する) ための使用法。

【発明の詳細な説明】

【0001】本発明は、蛋白質及び他の生体分子、特にアクセプター蛋白質の固定化に適当である被覆担体及びその製造法に関する。これは改良されたバイオセンサー及び生体分析具の製造を可能にする。

【0002】蛋白質及び他の生体分子の固定化は、多くの分析法及び生物学プロセスに対して重要である。ここで言及する分析法は特に固相の免疫分析並びに固定化のために免疫グロブリン (抗体) の取扱い性が改善されたバイオ及び免疫センサーである。現在の技術によれば、蛋白質はイオン性又は疎水性相互作用によって固体表面に吸着的に結合せしめられ、或いは補助試剤を用いることにより共有結合で連結せしめられる。後者の方法で言及しうる現在では古典的な例としては、ガラスの APTS (3-アミノプロピルトリエトキシシラン) 及びグルタルアルデヒドによる活性化、続く蛋白質の結合、更に随時続く得られるシッフ塩基の水素化ホウ素ナトリウムによる還元が言及しうる。免疫分析に用いる方法の総説は、P. ティジューセン (Tijssen)、「酵素免疫分析の実際と理論」、297~328 頁 [エルセビア (Elsevier)、アムステルダム、1987 年] を参照のこと。生物学プロセスに対しては、酵素の、透過性重合体又は膜中へのカプセル化法が更に通常である。

【0003】吸着による方法は蛋白質の固定化の安定性に欠けるという欠点を有するが、一方カップリング又は

活性化剤を用いる共有結合はしばしば比較的多い工程数、高純度で不安定な試剤の使用又はすべての蛋白質には適合しない反応条件の適用を必要とする。蛋白質固定化の効率は、蛋白質の変性のため又は表面の蛋白質による過度に低い被覆のためにしばしば不完全である。更にいくつかの活性化剤は架橋しうるので、十分に定義できない表面をもたらす。斯くして固定化の再現性も非常に貧弱である。

【0004】本発明において、これらの問題は、薄いフィルム形成重合体、即ち

a) 不活性な固定表面にしっかりと接着する、且つ

b) 固定化すべき蛋白質と共有結合する反応性基を有する

重合体で被覆された新規な被覆担体を製造することによって解決される。

【0005】本発明の利点は、固定化プロセスを、本質的に 2 つの工程、即ち

a) 固定の被覆

b) 蛋白質の、被覆固体への共有結合

に減じたことにある。

【0006】フィルム形成 (層形成) 工程は、種々の方法で行うことができる。ラングミュア-プロジェクト

(LB) 法、自己集合 (Self-Assembly) (SA) 技術、又はこれらの組合せが使用できる。両方法は、A. ウルマン (Ullman)、「有機超薄膜入門」、第 2 部 101~132 頁及び第 3 部 237~304 頁 [アカデミック・プレス (Academic Press)、サン・ディエゴ、1991 年] に記述されている。特に独国公開特許第 4,026,978 号及び第 4,208,645 号に記述されている SA 法、即ち官能性にしうるポリイオンの層を用いるそれは、取り扱いの容易性及び所望の形の固体及び空洞を被覆しうる可能性のために本発明の目的のために非常に適当である。

【0007】斯くして本発明は、

a) 不活性な固体及び

b) ラングミュア-プロジェクト (LB) 法又は自己集合 (SA) 技術に適当な重合体の単分子層、からなり、但し

c) 該重合体が、生物起源の分子を結合するのに適当な活性基を親水性スペーサー基の端に位置して有する共単量体を、すべての共単量体のモル数に対して 0.8~20 モル%、好ましくは 2.5~10 モル%で含有し、そして

d) 不活性な担体 a) 及び単分子層 b) との間に、c)

による活性基を含まない、LB 法又は SA 技術に適当な重合体の単分子層を 0~200 配置させる、被覆固体に関する。

【0008】更に本発明は、不活性な担体をラングミュア-プロジェクト (LB) 法に従って又は自己集合 (SA) 技術に従って、これらの技術に適当な重合体の単分

子層で被覆する、但し該重合体が、生物起源の分子を結合するのに適当な活性基を親水性スペーサー基の端に位置して有する共単量体を、すべての共単量体のモル数に対して0.8~20モル%で含有し、そして該不活性な担体及び該単分子層の間に、該活性基を有する共単量体を含まない、LB法又はSA技術に適当な重合体の単分子層を0~200配置させる、被覆担体の製造法に関する。

【0009】最後に本発明は、被覆担体の、生物起源の分子を結合させる（固定化する）ための使用方法に関する。

【0010】本方法においては、最上の蛋白質を結合する層のより良き接着を保証するために、不活性な固体を最初にフィルム形成物質の1層又はそれ以上で下被覆することもできる。LB法を用いる場合、固体は平面構造とできるだけ均一な表面極性を有すべきである。SA技術によりポリイオンで被覆する場合、表面の荷電した物質は例えば表面の酸化されたプラスチックの場合のように、それ自体が続いて導入されるものを提供する。

【0011】不活性な固体として特に興味あるものは、生体分析を行う或いはバイオセンサーの表面を作成するのに適したすべての材料である。生体分析は例えばスポットプレート、試験細片又はフロー系を用いて行われる。典型的な材料はプラスチック、改変バイオポリマー及びガラスである。バイオセンサーは多くの方法で製造することができる。検知法（電気化学的、光学的方法など）に依存して、本発明に従って使用しうる表面としては、金属電極、半導体表面、膜被覆電極、光伝導性又は光透過性材料（ガラス、プラスチック）、石英レゾネーター又は表面レゾネーターが修飾しうる。

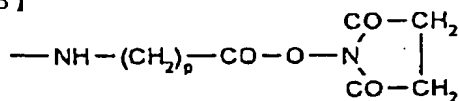
【0012】適当な反応性基は、古典的な蛋白質固定化法から公知の基、例えばN-ヒドロキシサクシンイミド基、イソシアネート、イソチオシアネート又はニトロフ*



【0017】 $-\text{NH}-\text{NH}_2$ 又は $-\text{NH}-\text{NH}_3^+ \text{Cl}^-$ 、

【0018】

【化3】

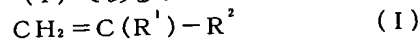


【0019】又は $-\text{NH}-(\text{CH}_2-)_p-\text{O}-\text{SO}_2-\text{R}^5$ 、を表わし、 R^5 は CH_3 、 $\text{C}_p\text{F}_{2p+1}$ 、フェニル又はトリルを示し、 R^6 は $-(\text{CH}_2)_n-\text{CO}-\text{Y}$ 又は Y を示

* エニルエステル (NH_2 の固定化)、ヨードアセトアミド又はマレイミド基 (SH の固定化)、或いはヒドラジド基（過ヨウ素酸塩処理により開裂した糖蛋白質の結合）である。

【0013】重合体主鎖への直接的な結合、例えばN-ヒドロキシサクシンイミジルメタクリレートへの導入は、満足しうる蛋白質の固定化には至らない。これらの基を十分な長さの親水性スペーサー基を介して重合体主鎖に連結し、この結果として反応性基が水性媒体中において結合させるべき蛋白質に近づく易くすることが有利であるということが発見された。スペーサー基の場合、原子数3以上、好ましくは5~30、特に好ましくは7~30、非常に特に好ましくは13~30のヘテロ原子を含む炭化水素鎖、特にオリゴエチレンオキシド鎖は適当であることが判明した。この種の基の例は次の単量体

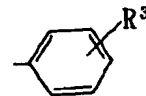
(I) である：



【式中、 R^1 はH又は CH_3 を表わし、そして R^2 は基

【0014】

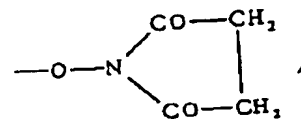
【化1】



【0015】又は $-\text{CO}-\text{O}-\text{R}^4$ を表わし、但し R^3 は $-(\text{CH}_2-)_n$ 、 $-\text{SO}_2-(\text{CH}_2-)_n$ 、 $-\text{N}=\text{C}=\text{X}$ を表わし、なお $\text{X}=\text{S}$ 又は O であり、或いは R^3 は $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{Y}$ 、を表わし R^4 は $-(\text{CH}_2)_n$ 、 $-\text{NH}-\text{CO}-\text{Y}$ 、 $-\text{CH}(\text{R}^1)-\text{CH}_2-\text{O}-$ 、 $-\text{SO}_2-\text{R}^5$ 又は $-\text{CH}(\text{R}^1)-\text{CH}_2-\text{O}-$ 、 $-\text{CO}-\text{R}^6$ を表わし、但し Y は

【0016】

【化2】



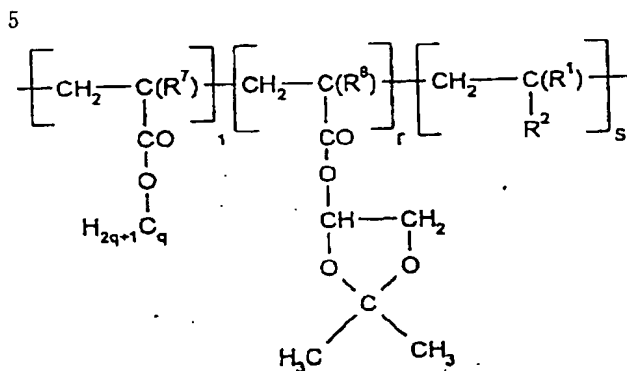
し、 m 及び n は互いに独立に1~4の整数であり、そして o 及び p は互いに独立に1~9の整数である】。

40 【0020】好適な親水性スペーサー基は単位数5~9のオリゴエチレンオキシド又はオリゴプロピレンオキシド基である。

【0021】これらは、例示すると、LB法に適当な次の重合体に導入することができる：

【0022】

【化4】



【0023】〔式中、 R^1 及び R^2 は言及した意味を有し、 R^7 及び R^8 は互いに独立に H 又は CH_3 を示し、 q は 12~22、好ましくは 16~18 の整数を表わし、 r は 0.6~1.25、好ましくは 0.8~1.1、特に好ましくは 0.9~1.05 の値を示し、そして s は 0.02~0.4、特に 0.05~0.2 の値を示す〕。

【0024】不活性な固体と重合体 (II) の単分子層の間に、0~200、好ましくは 0~50、特に 0~20 層の、高度に配列した重合体層を介在させてもよい。この重合体は添字 s に関わる単量体を含まない式 (II) の重合体に由来してもよい。

【0025】SA 技術を行うのに適当な重合体は、1 より多い電荷を有するもの、従ってポリイオンである。

【0026】適当なポリカチオンは、例えばアミノ官能基及びスルホニウム官能基を含有する化合物、例えばポリリシン、ポリアルリアルアミン、ポリエチレンイミン、ポリビニルピリジン、アミノ官能基で改変した (メト) アクリレート (例えばポリ-N,N-ジメチルアミノエチルメタクリレート)、デキストラン (例えば DEAE-デキストラン) 及び更にキトサンである。アミノ化合物は、簡単なプロトン化により又は四級化によりイオン化状態に転換することができる。

【0027】適当なポリアニオンは例えばポリカルボン酸、ポリホスホン酸及びポリスルホン酸である。これらの例はポリグルタメート、ポリ (メト) アクリル酸、ポリスチレンスルホン酸又はデキストランサルフェートである。

* 【0028】LB 法に関して上述したものと同様の方法により、SA 技術に適当な上述したポリイオンの 0~200 層を不活性な担体に付着させることができる。この付着させるべき重合体は、それぞれの場合公知の方法に従い、反対の意味において交互に荷電せしめられる。被覆すべき担体も一般に同様に、付着させる第 1 の重合体層に対して反対の意味での荷電を有するように予備処理する。

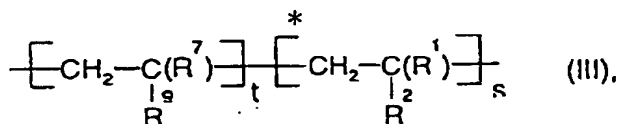
20 【0029】最終層としては、SA 技術を用いる時でさえ、親水性スパーサー基が端に位置する、生物起源の分子を結合させるための上述した複数の活性基を有する単量体 (式 (1)) を、すべての共単量体の全数に対して 0.8~20、好ましくは 2.5~10 モル% 含有するポリイオン性重合体を付着させる。

【0030】最終層として、ポリカチオンを付着させ且つこのカチオン性基がヒドラジン基 ($-\text{NH}-\text{NH}_2$ 又は $-\text{NH}-\text{NH}_2\text{HCl}$) である場合、これらのヒドラジン基はその下層にあるポリアニオン層にイオン結合し、そしてその量がイオン結合数を越えるならば生物起源の分子をも結合することができる。そのような場合、活性基は本発明による 0.8~20 モル% の含量以上の 100 モル% までを構成してもよい。

【0031】上式 (II) と同様に、SA 技術の場合、最上層に対して使用しうる重合体は下式のものである：

【0032】

〔化 5〕

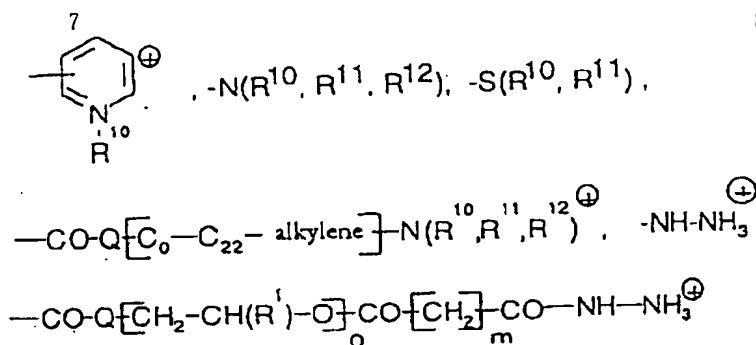


【0033】〔式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 及び s は上に示した意味を有し、 t は 1.6~2.25、好ましくは 1.8~2.1、特に好ましくは 1.9~2.05 の値を示し、そして R^3 は $-\text{SO}_3^-$ 、 $-\text{C}_6\text{H}_4-\text{SO}_3^-$ 、 $-\text{COO}^-$ 及

び $-\text{O}-\text{PO}_3^-$ からなる群からのアニオン或いは

【0034】

〔化 6〕



【0035】からなる群からのカチオンを示し、但し R^{10} 、 R^{11} 及び R^{12} は互いに独立に水素、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_{22}$ アルキル、フェニル又はベンジルを示し、そしてQはO又はNHを表わし、添字o及びmは互いに独立に1～9の整数を表わす】。

【0036】ポリアニオンの場合、反対に荷電されたイオンは H^+ 、アルカリ金属又はアルカリ土類金属カチオン、 NH_4^+ 、或いは完全に又は部分的に $\text{C}_1 \sim \text{C}_{22}$ アルキル、フェニル又はベンジルで置換されたアンモニウムである。

【0037】ポリカチオンの場合、イオンは OH^- 、ハライド、サルファート、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_{22}$ アルキルスルホネート、又はフェニルスルホネートである。

【0038】カチオンはSA技術を用いる場合、水又は酸の作用により、例えば ---NH_2 及び水から生成することもできる($\text{---NH}_3^+ \text{OH}^-$)。

【0039】ポリアニオンの場合、好適なものはビニル重合しうる酸例えばポリ(メト)アクリル酸又はポリスチレンスルホン酸である。これらの場合、反応性基の導入はLB法の重合体の場合と丁度同じように反応性単量体を介して起こる。SA技術に対して適当な重合体の合成には、同一の反応性単量体(式I)が好適に用いられる。

【0040】ポリカチオンでは、式(III)の関連において R^{\oplus} として言及したピリジニウム、アンモニウム又は ---CO---O--- アルキレンアンモニウムカチオンを有するものが好適である。

【0041】反応性基のモル含量は20～0.8、好ましくは10～2.5%である。

【0042】上述したLB法と同様に、式(III)の添字sは最上層の下0～200の層に対しては0の値である。斯くして下の方の層では、ポリアニオン又はポリカチオンが活性基を有さない。ヒドラジン基の特別な状態は、すでに上述した通りである。

【0043】公知の方法において、LB法に適当な溶媒は、重合体を溶解するが、表面上に重合体を広げるための媒体とは混和しないものである。媒体が水の重要な場合には、そのような溶媒は例えば塩化メチレン及び他のハロゲン化脂肪族炭化水素、芳香族系の(ハロゲン)炭化水素、水と混和しないエステル及び同業者には公知の

他のものである。

【0044】SA技術に対する適当な媒体は、水の場合、高極性の、随時水と混和しうる溶媒例えば水溶性のアルコール及びエーテル、ジメチルスルホキシド、パーアルキル酸アミド及びその他同業者には公知のものである。

【0045】生物学的起源の分子は、例えば蛋白質、ステロイド、代謝物、ビタミン、核酸、好ましくは生物学的レセプター分子、例えば免疫グロブリン、レクチン又は酵素、例えばグルコースオキシダーゼ、ウレアーゼ、抗体である。

【0046】固定化すべき蛋白質は、免疫グロブリンの場合、開裂によるFab断片を得た後、又はグリコシド基を過ヨウ素酸塩で開裂した後、並びに免疫グロブリンの場合には補助蛋白質、例えば蛋白質A又は蛋白質Gを介して、予備処理なしに用いることができる。本方法で固定化された蛋白質を用いると、コンカバリンA及びマンノースに対するヨーロッパ特許第429,907A号に記述されているものと同一の方法でフェルスター(Foerster)エネルギー遷移により抗原の結合が検知できる。

【0047】

【実施例】

実施例1

反応性基1を有する反応性重合体1の合成

メタクリル酸ステアリル4g、4-メタクリロイル-2,2-ジメチルジオキソラン2.36g、m-イソプロペニル- α , α -ジメチルベンジルイソシアネート[m-TMI[®]、アメリカン・サイアナミド社(American Cyanamid Co.)]0.24g及びアゾビスイソブチロニトリル10mgをジオキサン55ml中に導入した。装置を脱気し、純粋な窒素を送入し、このサイクルを2回繰返し、混合物を70℃で6時間攪拌した。この粗溶液にp-ニトロフェノール0.2g及びジアザビシクロ[2.2.2]オクタン10mgを添加した。次いで溶液を55℃で16時間攪拌した。冷却後、この粗溶液をメタノール200mlに滴下し、沈降する白色の沈殿を吸引濾別した。

【0048】収量：5.2g、理論収量の76.5%に相当。

【0049】この¹H-NMRは、m-TMIを含むために7～7.5 ppmの範囲にある重合体に典型的なブロードの共鳴吸収、3.5～4.5 ppmにエステル官能基に隣るプロトン及びアルキル残基による0.7～2.2 ppmの吸収を示した。¹⁴ Nの元素分析はN 0.4 %であり、反応性基4モル%に相当した。

【0050】実施例2

a) 反応性基2の製造

6-アミノヘキサノール5 gを窒素下に塩化メチレン95 mlに溶解し、そして塩化メチレン15 mlに溶解したイソシアナトエチルメタクリレート6.6 gを室温でゆっくりと添加し、混合物を2時間攪拌した。塩化メチレンを直空下に留去し、残渣をジエチルエーテル中で結晶化させた。収量：9.8 g、理論収量の84.5 %に相当。

【0051】¹H-NMRは、5.45及び5.55 ppmに尿素プロトン、5.6及び6.1 ppmにビニルプロトン、及び1.2～1.7 ppmにアルキル共鳴を示した。

【0052】b) 反応性重合体2の合成

メタクリル酸ステアリル4 g、メタクリロイルジメチルジオキソラン2.36 g、実施例2 a)からの物質0.32 g、及びアゾビスイソブチロニトリル10 mgをジオキサン55 mlに溶解した。装置を脱気し、純粋な窒素を仕込み、このサイクルを2回繰返し、混合物を70℃で6時間攪拌した。冷却した溶液をメチルスルホニルクロライド0.15 g及びピリジン0.15 gで処理し、40℃で2時間攪拌した。冷却後にこの粗溶液をメタノール200 mlに滴下し、沈降する白色沈殿を水洗し、次いで吸引濾別した。収量：5.2 g、理論収量の76 %に相当。

【0053】¹H-NMRは、0.7～2.2 ppmにアルキル範囲及び3.5～4.5 ppmにエステル官能基に隣るプロトンという重合体に典型的なブロードな共鳴吸収を示した。³² Sの元素分析はS 0.45 %を与え、これは反応性基4.1モル%に相当した。

【0054】実施例3

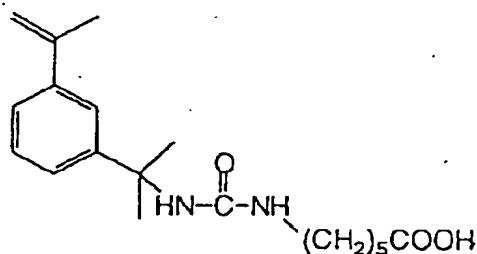
a) 反応性重合体3及び4並びに反応性基3の合成

メタクリル酸ステアリル及びメタクリロイルジメチルジオキソランのそれぞれ2.45 g及びアゾビスイソブチロニトリル150 mgをジオキサン15 mlに溶解した。この混合物に、反応性基3（式は下式参照、独国公開特許第4,202,051号の実施例1の製造法による）を0.25 g（重合体3に対して）又は0.5 g（重合体4に対して）添加し、これを70℃で18時間攪拌した。冷却後にN,N'-ジサクシンイミジルカーボネート0.5 g（重合体3に対して）又は1 g（重合体4に対して）を添加し、混合物を50℃で5時間攪拌した。この粗溶液をメタノール500 mlに滴下し、得られた沈殿を濾別し、水洗し、乾燥した。¹H-NMRは、7～7.5 ppmに芳香族環、3.5～4.5 ppmにエステル官能

基に隣るプロトン及び0.7～2.2 ppmにアルキル残基の、重合体に典型的なブロードな共鳴吸収を示した。¹⁴ Nの元素分析は重合体3に対してN 0.3 %及び重合体に対してN 0.5 %を示した。これらはそれぞれN-ヒドロキシサクシンイミド(=NHS)-活性化反応性基2.1モル%又は3.6モル%に相当した。

【0055】

【化7】



【0056】反応性基3

b) 反応性重合体5及び6の合成

ジメチルスルホキシドをジオキサンの代りに溶媒として用いる以外実施例3 a)の実験を繰返した。¹⁴ Nの元素分析は、重合体5に対してN 0.4 %及び重合体6に対してN 0.7 %を与え、それぞれ実施例3 a)からのNHS-活性化反応性基2.8モル%又は5モル%に相当した。

【0057】実施例4

反応性重合体7の合成

メタクリル酸ステアリル3.38 g、メタクリロイルジメチルジオキソラン2 g、及び更にアゾビスイソブチロニトリル100 mgをジオキサン25 mlに溶解した。この混合物に実施例3からの反応性基3を0.54 g添加し、これを70℃で20時間攪拌した。冷却後、NHS 0.2 g及びジシクロヘキシルカルボジイミド0.4 gを添加し、この混合物を室温で16時間攪拌した。この粗溶液をメタノール400 mlに滴下し、得られた沈殿を濾別し、水洗し、乾燥した。¹H-NMRは7～7.5 ppmに芳香族環、3.5～4.5 ppmにエステル官能基に隣るプロトン及び0.7～2.2 ppmにアルキル残基の、重合体に典型的なブロードな共鳴吸収を示した。¹⁴ Nの元素分析はN 0.9 %を与え、実施例3からの反応性基3の6モル%に相当した。

【0058】実施例5

a) 反応性基4の製造

平均分子量350のエチレンオキサイドオリゴマーのメタクリル酸エステル（日本油脂、ブレンマー（Blenmer）PE-350[®]）5 g、無水コハク酸1.13 g及び2,5-ビス-tert-ブチルフエノール10 mgをジオキサン40 mlに溶解し、濃硫酸5滴を添加し、混合物を還流下に12時間沸とうさせた。硫酸をナトリウムメトキシドで中和し、溶液を濃縮した。この残渣を塩化メチレン中に入れ、溶液を濾過した。濾液を高真空下に濃縮

し、残渣を乾燥した。¹H-NMRは、5.55及び6.1 ppmにビニルプロトン、3.65 ppmにエチレンオキシド単位、4.25 ppmにエステル官能基に隣るプロトン、及び2.65 ppmに α -カルボニルプロトンを示した。

【0059】b) 反応性重合体8の合成

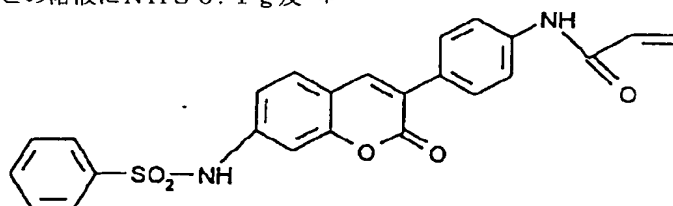
p-スチルスルホン酸ナトリウム1.3 g、実施例5 a)からの反応性基4の0.2 g及びクマリン染料1 (式は下式参照、独国特許公報第4,114,482 A 1号の実施例2も参照) 0.5 gをジメチルスルホキシド 10 10 mlに溶解し、そしてアゾビスイソブチロニトリル 20 mgの添加後に混合物を65℃で15時間攪拌した。この粘稠な粗溶液をエタノール100 mlに滴下し、得られた沈殿を吸引濾別し、ジメチルスルホキシド 12 mlに再び溶解した。この溶液にNHS 0.1 g及 *

*びジシクロヘキシルカルボジイミド0.2 gを添加し、これを室温で16時間攪拌した。この溶液をエタノール 100 mlに滴下し、沈殿を吸引濾別し、高真空で乾燥した。¹H-NMRは、3.65にエチレンオキシド、6.5~8.5 ppmの芳香族及び0.7~2 ppmに脂肪族のプロトンの、重合体に典型的なブロードの吸収帯を示した。純粋な染料に標準化した385 ppmにおけるモル吸光は、重合体中の染料含量20重量%を示した。

【0060】¹⁴Nの元素分析はN 1.45%を与え、実施例5 a)からのNHS-活性化の反応性基4モル%に相当した。

【0061】

【化8】



【0062】クマリン染料1

実施例6

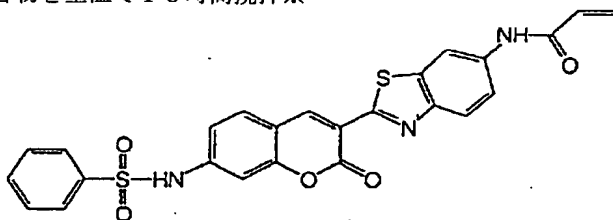
反応性重合体9の合成

メタクリル酸ステアリル2.14 g、メタクリロイルジメチルジジオキソラン1.06 g、クマリン染料2 (構造式は下記参照、独国公開特許第4,213,323号の実施例3も参照) 0.75 g及びアゾビスイソブチロニトリル41 mgをジメチルアセトアミド10 mlに溶解し、この混合物に実施例3 a)からの反応性基3の0.142 gを添加し、これを70℃で20時間攪拌した。30 冷却後、NHS 49 mg及びジシクロヘキシルカルボジイミド88 mgを添加し、混合物を室温で16時間攪拌※

※した。この粗溶液をメタノール400 mlに滴下し、得られた沈殿を濾別し、水洗し、そして乾燥した。¹H-NMRは、6.3~8.3 ppmに芳香族、3.5~4.5 ppmにエステル基に隣るプロトン、及び0.7~2.2 ppmのアルキル残基のプロトンの、重合体に典型的なブロードの共鳴を示した。純粋な染料に標準化した480 ppmにおける吸光度は、重合体中の染料含量15重量%を示した。¹⁴Nの元素分析はN 1.5%を与え、実施例3からのNHS-活性化反応性基3の4モル%に相当した。

【0063】

【化9】



【0064】クマリン染料2

実施例7

a) 反応性基5の製造

炭酸ナトリウム1 g及び実施例5 a)からの反応性基4の2 gを0℃下にアセトニトリル5 ml中に導入し、そしてアセトニトリル5 ml中クロルギ酸イソブチル0.51 gを滴下した。この混合物を室温で1時間攪拌し、アセトニトリルを更に10 ml添加し、混合物を窒素雰囲気下に濾過した。濾液を、アセトニトリル5 ml中ヒドラジン水和物0.18 gの溶液に0℃で滴下し、この混合物をこの温度で2時間攪拌した。次いで溶液を濾過

40 し、1 N酸塩でpH 4に調節し、高真空下に濃縮した。黄色の粘稠な油が残った。

【0065】¹H-NMRは、5.55及び6.1 ppmにビニルプロトン、3.65 ppmにエチレンオキシド単位、4.3 ppmにエステル官能基に隣るプロトン及び2.65 ppmに α -カルボニルプロトンを示した。¹⁴Nの元素分析は4.8重量%であり、反応性基4.88モル%に相当した。

【0066】b) 反応性重合体10の合成

p-スチレンスルホン酸ナトリウム0.65 g、実施例7 a)からの反応性基0.1 g及び実施例5 b)からのク

マリン染料 1 の 0.25 g をジメチルスルホキシド 4 ml に溶解し、そしてアゾビスイソブチロニトリル 10 mg の添加後に混合物を 65℃ で 15 時間撹拌した。粘稠な粗溶液をエタノール 60 ml に滴下し、得られた沈殿を吸引濾別し、高真空下に乾燥した。¹H-NMR は、3.65 にエチレンオキシド、6.5~8.5 ppm の芳香族及び 0.7~2 ppm に脂肪族のプロトンの、重合体に典型的なブロードの吸収帯を示した。純粋な染料に標準化した 385 ppm におけるモル吸光は、重合体中の染料含量 20 重量% を示した。

【0067】¹⁴N の元素分析は N 1.64% を与え、実施例 7 a) からの反応性基 4 モル% に相当した。

【0068】実施例 8

対照重合体 11 の合成

メタクリル酸ステアリル 3.38 g 及びメタクリロイルジメチルジオキソラン 2 g を、アゾビスイソブチロニトリル 100 mg と共にジオキサン 20 ml に溶解し、混合物を 70℃ で 2 時間撹拌した。冷却後に粗溶液をメタノール 200 ml に滴下し、得られた沈殿を濾別し、メタノールで洗浄し、乾燥した。¹H-NMR は 3.5~4.5 ppm にエステル官能基に隣るプロトン及び 0.7~2.2 ppm にアルキル残基のプロトンという高分子に典型的なブロードの共鳴吸収を示した。

*

| 物質 | 吸光度 (634 nm) |
|----------|---------------------|
| 反応性重合体 1 | 1.46 |
| 反応性重合体 2 | 0.64 |
| 反応性重合体 2 | 1.44 |
| 反応性重合体 3 | 0.317 |
| 反応性重合体 4 | 0.436 |
| 反応性重合体 5 | 0.471 |
| 反応性重合体 6 | 1.503 |
| 反応性重合体 7 | 0.861 |
| 反応性重合体 8 | 1.912 |
| 反応性重合体 9 | 2.16 |
| 対照重合体 11 | 0.06 (反応性基なし) |
| APTS/GA | 0.363 (対照試料、通常の活性化) |

(下記参照)

反応性基 (吸着的結合) を有さない試料と比べて、また常法によりアミノプロピルシラン及びグルタルアルデヒドで処理した試料 (APTS/GA) と比べて、向上した酵素活性が検知できた。

【0071】実施例 10

免疫グロブリンの、蛋白質 A を介しての固定化

LB 層 (物質: 反応性重合体 9) で被覆したポリカーボネートフィルム [「マクロフォル (Macrofol)」] の細片を、2 つの担体間に 0.1 mm の空隙が生ずるように厚さ 0.1 mm のテフロンテープを端に貼りつけたカバーガラスで覆った。この空間に蛋白質 A の溶液 (炭酸塩緩衝液 (0.01 モル/l, pH 8.0) 中 0.1 mg/l) 0.25 ml を通し、次いでこれを終夜室温に保温

* 【0069】実施例 9

β-ガラクトシダーゼの固定化

ガラス又はプラスチック担体を、LB 層 (独国公開特許第 3,938,598 号の方法) 又は SA 層 (独国公開特許第 4,208,645 号の方法) で被覆し、そして 2 つの支持体間に 0.1 mm の空隙ができるように厚さ 0.1 mm のテフロンテープを端に貼りつけた同一種の第 2 の担体で覆った。この中間の空間を β-ガラクトシダーゼの溶液 (1 mg/ml, 炭酸塩緩衝剤 10 ミリモル, pH 8) 1 ml で満し、次いで室温で 1 時間処理した。次いで試料担体から覆いを除去し、担体を EPPS 緩衝液 (N-[2-ヒドロキシエチル] ピペラジン-N'-[3-プロパンスルホン酸] (EPPS) 0.1 モル/l, MgCl₂ 1 ミリモル/l, NaN₃ 0.05%, 牛の血清アルブミン 0.1 g/l, pH 8) で 3 回洗浄した。このプレートを、EPPS 緩衝液中ジメチルアクリジノン-ガラクトシド (DMAG) の 0.5 ミリモル/l 溶液 2 ml と共に 1 時間 37℃ に保温した。次いでこの溶液をキュベットに移し、未処理の DMAG 溶液に対して、634 nm における分光法で測定した。結果を下表に示す。

【0070】

した。次いでカバーガラスを除去し、フィルムをクエン酸塩緩衝液 (クエン酸塩 25 ミリモル/l, 燐酸カリウム 15 ミリモル/l, KCl 0.5 モル/l, 及び MgCl₂ 1 ミリモル/l) でゆすいだ。次いでこれを抗ジゴキシン-I g G の溶液 (クエン酸塩緩衝液 (pH 6.4) 中 0.2 mg/l) 0.5 ml で湿めらせ、再び覆いをした。室温で 1 時間後、カバーガラスを再び除去し、フィルムをクエン酸塩緩衝液 (pH 6.4) 2 ml で再び洗浄し、乾燥させ、比較的小さい試験片に切断した。これらの試験片を、テトラメチルローダミンで標識したジギトキシゲニンの溶液 (クエン酸塩緩衝液 (pH 6.4) 中 1 μg/ml) に浸漬し、蛍光を 515 及び 577 nm (励起: 405 nm) で測定した。577 と

515 nmの蛍光の比（独国公開特許第3,938,598号に記述されている如きフェルスター（Foerster）エネルギー遷移）を用いることにより、ジギトキシゲニン誘導体の固定化された免疫グロブリンへの結合及びその*

典型的なTRITC-ジギトキシゲニンの結合挙動

| | |
|-----------------|------|
| TRITC-ジギトキシゲニン前 | 0.51 |
| TRITC-ジギトキシゲニン後 | 1.80 |
| 1回洗浄 | 1.82 |
| 2回洗浄 | 1.50 |
| 3回洗浄 | 1.79 |
| 水で再び洗浄 | 2.26 |

実施例 11

ディック（Dig）Bの、ヒドラジド化学を用いる固定化

SA層（ポリリシン下被覆物上に反応性重合体10）で被覆した表面活性化PETフィルム〔アグファ（Agfa）、「ゴールド」175 μm〕の細片を、2つの担体間に0.1 mmの空隙ができるように厚さ0.1 mmのテフロンテープを端に貼りつけたカバーガラスで覆った。20 次いでこの中間の空間に、予じめ過ヨウ素酸塩酸化に供した抗ジゴキシン-IgGの溶液（0.01 M NaIO₄、0.5 ml中IgG 4 mg、0.1 M酢酸塩緩衝液（pH 5.5）、室温に45分間保温し、次いでバイオゲルP6Gで脱塩したもの）1 mlを導入した。8℃に終※

典型的なTRITC-ジギトキシゲニンの結合挙動

| | |
|-----------------|------|
| TRITC-ジギトキシゲニン前 | 0.12 |
| TRITC-ジギトキシゲニン後 | 0.62 |
| 1回洗浄 | 0.51 |
| 2回洗浄 | 0.49 |
| 3回洗浄 | 0.52 |
| 4回洗浄 | 0.46 |

本発明の特徴及び態様は以下の通りである：

1. a) 不活性な固体及び
- b) ラングミュア-プロジェクト（LB）法又は自己集合（SA）技術に適当な重合体の単分子層、からなり、但し

c) 該重合体が、生物起源の分子を結合するのに適当な活性基を親水性スペーサー基の端に位置して有する共単量体を、すべての共単量体のモル数に対して0.8～20モル%、好ましくは2.5～10モル%で含有し、そして

d) 不活性な担体a) 及び単分子層b) との間に、c) による活性基を含まない、LB法又はSA技術に適当な重合体の単分子層を0～200配置させる、被覆担体。

【0074】 2. 活性基を親水性スペーサー基の端に位置して有する上記の1c) の共単量体が、式
 $\text{CH}_2=\text{C}(\text{R}^1)-\text{R}^2$

* の、クエン酸塩緩衝液（pH 6.4）での洗浄に対する安定性を検知することが可能であった（下表参照）。

【0072】

蛍光比577/515

※夜保温した後、フィルム片をクエン酸塩緩衝液（pH 6.4、実施例10を参照）でゆすぎ、乾燥させ、比較的小片に切断した。TRITCで標識したジギトキシゲニンを含有する溶液（ツウィーン（Tween）20の0.001容量%添加したクエン酸緩衝液（pH 6.4）ml 1 μg）に浸漬する前後において、これらの試料フィルムの蛍光を495及び557で測定した（励起：405 nm）。577と495 nmの蛍光比を用いることにより、ジギトキシゲニン誘導体の、固定化免疫グロブリンへの結合及びその、クエン酸塩緩衝液（pH 6.4）/ツウィーン20での洗浄に対する安定性を検出することができた（下表を参照）。

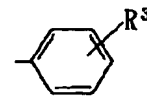
【0073】

蛍光比577/495

【式中、R¹はH又はCH₃を表わし、そしてR²は基

【0075】

【化10】

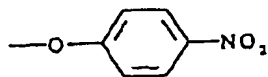


【0076】 又は $-\text{CO}-\text{O}-\text{R}^4$ を表わし、但しR³は $-(\text{CH}_2-)_n$ 、 $-\text{SO}_2-(\text{CH}_2-)_n$ 、 $-\text{N}=\text{C}=\text{X}$ を表わし、なおX=S又はOであり、或いはR³は $-\text{C}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{NH}-\text{CO}-\text{Y}$ 、 $-\text{NH}-\text{CO}-\text{Y}$ 、 $-\text{CH}(\text{R}^1)-\text{CH}_2-\text{O}-$ 、 $-\text{SO}_2-\text{R}^5$ 又は $-\text{CH}(\text{R}^1)-\text{CH}_2-\text{O}-$ 、 $-\text{CO}-\text{R}^6$ を表わし、但しYは

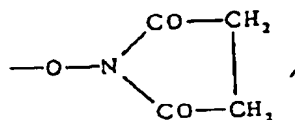
【0077】

【化11】

17

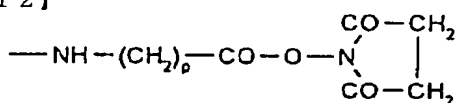
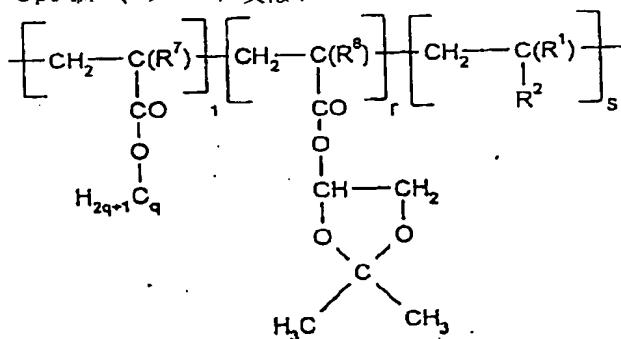


18

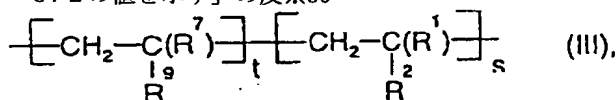
【0078】 $-\text{NH}-\text{NH}_2$ 又は $-\text{NH}-\text{NH}_3^+ \text{Cl}^-$ 、

【0079】

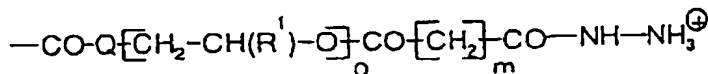
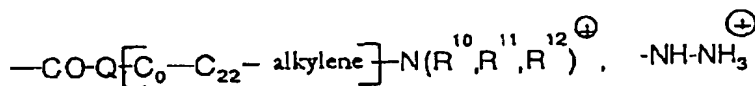
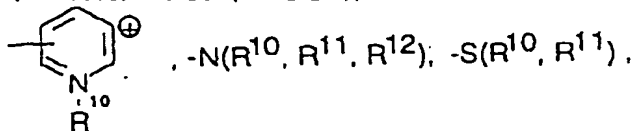
【化12】

【0080】又は $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_p-\text{O}-\text{SO}_2-$ R^5 、を表わし、 R^5 は CH_3 、 CpF_{2p+1} 、フェニル又は*

【0083】[式中、 R^1 及び R^2 は上記2に言及した意味を有し、 R^3 及び R^4 は互いに独立にH又は CH_3 を示し、 q は12~22、好ましくは16~18の整数を表わし、 r は0.6~1.25、好ましくは0.8~1.1、特に好ましくは0.9~1.05の値を示し、そして S は0.02~0.4、特に0.05~0.2の値を示す]の反※30



【0086】[式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 及び s は上記3に示した意味を有し、 t は1.6~2.25、好ましくは1.8~2.1、特に好ましくは1.9~2.05の値を示し、そして R^4 は $-\text{SO}_3^-$ 、 $-\text{C}_6\text{H}_4-\text{SO}_3^-$ 、 $-\text{CO}^+$ ★



【0088】からなる群からのカチオンを示す]の反復単位をランダムに有するものである上記1の担体。

*トリルを示し、 R^6 は $-(\text{CH}_2)_n-\text{CO}-\text{Y}$ 又は Y を示し、 m 及び n は互いに独立に1~4の整数であり、そして o 及び p は互いに独立に1~9の整数である]の1つを有する上記1の担体。

【0081】3. 上記1b)の、LB法に用いる場合の単分子層の重合体が式

【0082】

【化13】

※復単位をランダムに有するものである上記1の担体。

【0084】4. 上記1b)の、SA技術に用いる場合の単分子層の重合体が式

【0085】

【化14】

★ O^- 及び $-\text{O}-\text{PO}_3^-$ からなる群からのアニオン或いは

【0087】

【化15】

【0089】5. 親水性スペーサー基が、C原子及びヘテロ原子の双方を数えて5~30、好ましくは7~3

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN(11)Publication number : **07-027767**(43)Date of publication of application : **31.01.1995**

(51)Int.Cl.

G01N 33/547**B05D 1/20****C12Q 1/00****G01N 33/543**(21)Application number : **06-144095**(71)Applicant : **BAYER AG**(22)Date of filing : **03.06.1994**(72)Inventor : **HEILIGER LUDGER
SIEGMUND HANS-ULRICH**

(30)Priority

Priority number : **93 4319037** Priority date : **08.06.1993** Priority country : **DE****(54) COVERED CARRIER, MANUFACTURE THEREOF AND USAGE FOR FIXING ORGANIC MOLECULAR ON SURFACE OF SOLID**

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide a covered carrier which is suitable for fixing organic molecular such as protein and a method of manufacturing thereof.

CONSTITUTION: An inactive carrier is covered thereover with a monomolecular layer made of a special polymer so as to obtain a covered carrier. This polymer contains 0.8 to 20mol.% of comonomer having at is one end a reactive group which is covalently bonded to protein or another organic molecular to be fixed, through a spacer group, and 0 to 200 of monomolecular layers made of the polymer which does not contain a reactive group for improving the bonding between the carrier and the molecular layer are laid therebetween. Thus manufactured covered carrier can fix protein or another organic molecular with a high degree of efficiency and a high degree of reproducibility.

0、特に好ましくは13～30の原子数の鎖長を有する上記1の担体。

【0090】6. 親水性スペーサー基が5～9の単位数を有するオリゴエチレンオキシド基又はオリゴプロピレンオキシド基である上記1の担体。

【0091】7. 親水性スペーサー基の端に位置する活性基がヒドラジド、N-ヒドロキシサクシンイミド、ニトロフェニルエステル、イソチオシアネート、ヨードシアネート、ヨードアセトアミド、マレイミド、又はメチルスルホネート、好ましくはヒドラジドである上記2の担体。 10

【0092】8. 不活性な担体をラングミュア-ブロッジエット(LB)法に従って又は自己集合(SA)技術に

従って、これらの技術に適当な重合体の単分子層で被覆する、但し該重合体が、生物起源の分子を結合するのに適当な活性基を親水性スペーサー基の端に位置して有する共単量体を、すべての共単量体のモル数に対して0.8～20モル%で含有し、そして該不活性な担体及び該単分子層の間に、該活性基を有する共単量体を含まない、LB法又はSA技術に適当な重合体の単分子層を0～200配置させる、被覆担体の製造法。

【0093】9. 上記1の被覆担体の、生物起源の分子を結合させる(固定化する)ための使用法。

【0094】10. 固体の表面に最初に蛋白質A又は蛋白質G、次いで関連する免疫グロブリンを結合させる上記9の使用法。